

10 Rec'd PCT/PTO 28 JUN 2005

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年2月5日 (05.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/011654 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/57, (74) 代理人: 長井 省三, 外(NAGAI,Shozo et al.); 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo (JP).
1/15, 1/19, 1/21, 5/00, 9/64, C12Q 1/37, G01N 33/15, 33/50, 33/53, A61K 45/00, A61P 1/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009677 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2003年7月30日 (30.07.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2002-223878 2002年7月31日 (31.07.2002) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 武田 正敬 (TAKEDA, Masayoshi) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 山地 晃 (YAMAJI, Noboru) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL SERINE PROTEASE

(54) 発明の名称: 新規セリンプロテアーゼ

(57) Abstract: It is intended to disclose a novel polypeptide which is useful in searching for a remedy for a specific disease in which a digestive hormone participates (in particular, irritable bowel syndrome); a polynucleotide encoding the above polypeptide; an expression vector containing the above polynucleotide; and cells transfected with the above expression vector. The polypeptide as described above is a novel type II transmembrane serine protease or its derivative participating in the control of a hormone produced in the digestive tract. It is also intended to disclose a method of screening a remedy for a digestive disease with the use of the above polypeptide; and a process for producing a medicinal composition for treating a digestive disease which contains as the active ingredient a substance obtained by the above-described screening method.

(57) 要約: 消化管ホルモンの関わる特定の疾患、特に過敏性腸症候群治療薬の探索に有用な新規なポリペプチド、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び前記発現ベクターでトランスフェクトされた細胞を開示する。前記ポリペプチドは消化管で産生されるホルモンの調節に関わる新規なII型膜貫通セリンプロテアーゼ又はその前駆体である。また、前記ポリペプチドを用いた消化管疾患治療薬のスクリーニング方法並びに該スクリーニング方法により得られる物質を有効成分とする消化管疾患治療用医薬組成物の製造方法を開示する。

WO 2004/011654 A1

明 細 書

新規セリンプロテアーゼ

技術分野

本発明は、消化管ホルモンの制御に関わる新規なセリンプロテアーゼの前駆体または成熟体であるポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、及び該ベクターを含有する形質転換細胞に関するものである。

背景技術

これまでに数百種類のプロテアーゼが報告され、全ゲノムの約 1%がプロテアーゼをコードすると予測されている。これらのプロテアーゼの中には、単に蛋白やペプチドの消化を行う分子の他に、ペプチド鎖の切断を介して蛋白質の成熟や生理活性の発現、代謝の調節、情報の発現や伝達など生命現象に直結した重要な役割に関与している分子が多数あることが知られている。そのため、古くより、プロテアーゼ阻害剤の医薬品応用が進められてきており、実際、現在世界で販売されているトップ 50 の薬剤のうち、プロテアーゼ阻害剤は 32%を占めている。

II 型膜貫通セリンプロテアーゼはセリンプロテアーゼのうち、N 末端側に膜貫通領域、細胞外の C 末端側にプロテアーゼドメインを有する分子種であり(非特許文献 1 参照)、心房性ナトリウム利尿因子前駆体(proANP)から成熟体への変換を制御するコリン(Corin) (非特許文献 2 参照)、トリプシノーゲンをトリプシンに変換するエンテロペプチダーゼ(Enteropeptidase) (非特許文献 3 参照)など、重要な生理作用を調節する役割を担う分子が同ファミリーに分類される。また、これらの II 型膜貫通セリンプロテアーゼの多くは比較的限局した特徴ある組織分布を示すことが報告されている(非特許文献 1 参照)。また、これらのセリンプロテアーゼは膜付近の細胞外マトリクスに作用し、細胞の分化、細胞同

士の接着の緩和、上皮細胞での恒常性の維持、等に関与することが示唆されている（非特許文献 4、非特許文献 5、非特許文献 6 参照）。

小腸は栄養分の消化及び吸収を主とする消化管であるが、一方で、種々の生理活性ペプチドや、種々のホルモンの生産、分泌を担う内分泌器官でもあることが分かってきている（非特許文献 7 参照）。1902年に Bayliss, Starling らが小腸より腸外分泌を血行性に刺激する物質として抽出したセクレチンの発見以来、消化管ホルモンは、候補も含め 40 以上のものが報告されてきているが、それらの大部分が脳でも発現していることから別名を神経ペプチド、または脳-腸ホルモンと呼ばれている。これら生理活性ペプチドは、その前駆体のプロセッシングにより生成することが知られている。これら生理活性ペプチドは自律神経と共に腸管の機能を制御し、過敏性腸症候群の発症にこれらのペプチドの異常が関与しているとされている（非特許文献 8 参照、非特許文献 9 参照、非特許文献 10 参照）。

このうち血管作用性小腸ペプチド（vasoactive intestinal peptide ; VIP）は 28 アミノ酸から成り、中枢神経系、泌尿生殖器、呼吸器、唾液腺などの神経線維にも分布し、血管拡張や血流増加作用とともに、消化管の平滑筋を弛緩する作用を有している（非特許文献 11 参照）。また、最近になり、VIP には、抗炎症作用もあることが報告された（非特許文献 12 参照）。

健康成人に外因性の VIP を経静脈的に投与すると激しい下痢が引き起こされることが示されている（非特許文献 13 参照）。また、実験的にラットに下痢をおこさせると、門脈中の VIP 濃度が上昇することが報告されている（非特許文献 14 参照）。一方、恒常的な強い便秘をきたすヒルシュプルング病（Hirschsprung 病）において、VIP 陽性神経の減少、消失がみられている（非特許文献 15 参照）。また、突発性慢性便秘症においては、健常人に比べ、組織中の VIP 濃度が低下していることも報告されている（非特許文献 16 参照）。このように、VIP は下痢、便秘の発生と密接に関連している。

炎症性腸疾患においては、潰瘍性大腸炎患者の急性炎症反応が強い部位で、VIP 陽性神経の減少、消失がみられ、血管系の増生が顕著な部位では VIP 神経が網状に絡み合っている像を観察している（非特許文献 17 参照）。潰瘍性大腸炎の一種、クローン病（Crohn's Disease）のモデルである TNBS（trinitrobenzene

sulfonic acid) 誘発大腸炎モデルにおいて、皮下投与により VIP の抗炎症作用が発揮され、治療効果が認められている（非特許文献 18 参照）。

これらのことから、VIP は便秘症、特に女性患者数の多い便秘型の過敏性腸症候群の治療及び炎症性の消化管疾患の治療に有用であると考えられていた。ところが、VIP 自体の医薬応用は、VIP が体内で速やかに分解を受けるために血中半減期が短く（非特許文献 19 参照、非特許文献 20 参照）、加えて非経口投与性のために困難な状況にあった。

本発明のポリペプチド及びポリヌクレオチドと相同性のある配列に関しては種々の報告がある（特許文献 1－5 参照）が、本発明のポリペプチド及びポリヌクレオチドと 100% 同一の配列は知られていなかった。特許文献 1 には、本発明のポリペプチドと相同性を有する配列が関与するとして、実験的裏付けもなく消化管疾患を含む多数の疾患が列挙され、それらの疾患の予防、処置、又は診断に使用できるとの記載がされている。特許文献 2 には、本発明のポリペプチドが関与するとして多数の疾患名が列挙されている。特許文献 3 には本発明のポリペプチドの相同配列の制御は悪性細胞の転移、癌血管形成、炎症、アテローム性動脈硬化症、神経変性疾患、COPD、又は病原性感染の治療に特に有用であること、特許文献 4 には、本発明のポリペプチドの制御は癌、COPD、末梢又は中枢神経系や循環器病の治療に特に有用であることが記載されている。しかしながら本発明のポリペプチドが上記疾患に関与するとの実験的裏付けはなく、本発明のポリペプチドの生理機能に関する具体的な情報はなかった。特許文献 5 には具体的な用途の記載はなかった。

（特許文献 1）

国際公開第 02/38744 号パンフレット

（特許文献 2）

国際公開第 02/00860 号パンフレット

（特許文献 3）

国際公開第 01/96378 号パンフレット

（特許文献 4）

国際公開第02/08392号パンフレット

(特許文献5)

国際公開第03/040393号パンフレット

(非特許文献1)

「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(The Journal of Biological Chemistry)」、(米国)、2001年、第276巻、p. 857-860

(非特許文献2)

「プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッドステイツ・オブ・アメリカ(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)」(米国)、2001年、第97巻、p. 8525-8529

(非特許文献3)

「バイオケミストリー(Biochemistry)」(米国)、1995年、第34巻、p. 4562-4568

(非特許文献4)

「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(The Journal of Biological Chemistry)」、(米国)、2001年、第277巻、p. 303-309

(非特許文献5)

「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(The Journal of Biological Chemistry)」、(米国)、1997年、第272巻、p. 31315-31320

(非特許文献6)

「バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーションズ (Biochemical and Biophysical Research Communications)」、2001年、第287巻、p. 995-1002

(非特許文献7)

大根田昭；「メディコピア⑫消化とホルモナー病態と検査ー」1985年、p. 94-108

(非特許文献8)

「過敏性腸症候群の診断と治療」、1989年、p. 81-91

(非特許文献9)

「過敏性腸症候群の診断と治療」、1989年、p. 214-218

(非特許文献 10)

実験医学5、1987年、p. 531-534

(非特許文献 11)

「日本臨床」、1992年、第50巻、p. 2697-2702

(非特許文献 12)

Delgado M. et al., Nat. Med., 7, 563-569, 2001

(非特許文献 13)

「ニューイングランド ジャーナル オブ メディシン (New England Journal of Medicine)」、(米国) 1983年、第309巻、p. 1482-1485

(非特許文献 14)

Kishimoto S. et al., The 7th international symposium on gastrointestinal hormones, p. 26 (Abst), Shizuoka, 1988

(非特許文献 15)

「ニューロサイエンス レターズ (Neuroscience Letters)」、(アイルランド)、1982年、第34巻、p. 57-62

(非特許文献 16)

「(Gastroenterology.)」、(米国)、1988年、第94巻、p. 300-310

(非特許文献 17)

「バイオメディカル リサーチ (Biomedical Research)」、1991年、第12巻、p. 28

(非特許文献 18)

「(Gastroenterology)」、(米国)、2003年、第124巻、p. 961-971

(非特許文献 19)

「ヌクレアー メディシン アンド バイオロジー (Nuclear Medicine and Biology)」、(米国)、1994年、第21巻、p. 865-872

(非特許文献 20)

「ヌクレアー メディシン アンド バイオロジー (Nuclear Medicine and Biology)」、(米国)、1999年、第26巻、p. 931-936

発明の開示

本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、小腸で産生されるホルモンの切断やプロセシングに関わるヒトの新規な II 型膜貫通セリンプロテアーゼ遺伝子全長配列、全長 ORF を決定し、全長遺伝子及び組換え体蛋白質を取得した。次いで、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 51 番～第 531 番のアミノ酸配列からなるポリペプチドが前記プロテアーゼの細胞外領域であることを明らかにした。更に、合成ペプチドを用いてプロテアーゼ活性を測定する系を確立し、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 237 番～第 531 番のアミノ酸配列からなるポリペプチドが十分なプロテアーゼ活性を有することを見出した。加えて、活性型酵素を得る為に前記プロテアーゼの全長領域及び細胞外領域を用いることができることを見出した。また、前記プロテアーゼは小腸において強発現しており、肺、大腸、及び脾臓ではほとんど発現していないことを確認した。前記プロテアーゼが選択的に VIP を切断したことから、前記プロテアーゼによる切断が消化管疾患の原因であることを明らかにした。すなわち、小腸に発現し、VIP 切断活性を有する本発明のプロテアーゼ成熟体の活性を阻害することにより消化管疾患、特に便秘型の過敏性腸症候群の治療が可能であることを明らかにした。

これらの結果、本発明者らは消化管疾患治療薬の探索に有用な新規なポリペプチド、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、前記発現ベクターでトランスフェクトされた細胞、消化管疾患治療薬をスクリーニングする方法、並びに、消化管疾患治療用医薬組成物の製造方法を提供し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、

- [1] 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 237 番～第 531 番のアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示す酵素であるポリペプチド、
- [2] 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 237 番～第 531 番のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- [3] 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 51 番～第 531 番のアミ

ノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示す酵素の前駆体であるポリペプチド、

〔４〕配列番号２で表されるアミノ酸配列における第１番～第５０番のアミノ酸配列、あるいは配列番号２で表されるアミノ酸配列における第１番～第５０番のアミノ酸配列の１～１０個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入された配列を含むアミノ酸配列のＣ末端側に、配列番号２で表されるアミノ酸配列における第５１番～第５３１番のアミノ酸配列が連結されたアミノ酸配列を含み、かつ、プロテアーゼ活性を示す酵素の前駆体であるポリペプチド、

〔５〕配列番号２で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド又は配列番号２で表されるアミノ酸配列における第５１番～第５３１番のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

〔６〕〔１〕乃至〔５〕に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

〔７〕〔６〕に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

〔８〕〔７〕に記載の発現ベクターで形質転換された細胞

〔９〕ｉ）〔１〕又は〔２〕に記載のポリペプチドと、ii)前記ポリペプチドにより切断可能な基質と、iii)試験化合物とを接触させる工程、

前記基質の切断を分析する工程、及び

前記基質を切断する活性を阻害する物質を選択する工程

を含む、消化管疾患治療薬をスクリーニングする方法、

〔１０〕〔９〕に記載のスクリーニング方法を用いてスクリーニングする工程、

及び

前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程

を含むことを特徴とする、消化管疾患治療用医薬組成物の製造方法、

に関する。

本発明のポリペプチド及びポリヌクレオチドと相同性のある配列に関しては種々の報告がある（特許文献１～５参照）。特許文献１には、本発明のポリペプチドの相同配列が関与するとして、消化管疾患を含む多数の疾患が列挙され、それらの疾患の予防、処置、又は診断に使用できるとの記載がされている。しかし

ながら、それらの疾患に当該配列が関与するとの実験的裏付けは全くない。特許文献2には、本発明のポリペプチドの相同配列を含む多数のプロテアーゼが開示され、それらのプロテアーゼが関与するとして多数の疾患名が列挙されている。それら多数の疾患の中には消化管疾患に関する記載はない。また、実際に当該配列を現実を取得したとの実施例はなく、まして用途に関する実験的裏付けは全くない。特許文献5に本発明のポリペプチドの相同配列が記載されているが、実際に当該配列を現実を取得したとの実施例はなく、特定の具体的用途も記載されていない。特許文献3には本発明のポリペプチドの相同配列の制御は悪性細胞の転移、癌血管形成、炎症、アテローム性動脈硬化症、神経変性疾患、COPD、又は病原性感染の治療に特に有用であること、特許文献4には、本発明のポリペプチドの制御は癌、COPD、末梢又は中枢神経系や循環器病の治療に特に有用であることが記載されている。特許文献3には当該配列は脾臓、骨髄に高発現すること、肺での発現に注目していることが記載され、特許文献4には、当該配列は精巣及び大腸に高発現することが記載されている。特許文献3及び特許文献4における当該配列の小腸における発現は低かった。また、特許文献3及び特許文献4には当該配列が消化管疾患に関与するとの情報はなかった。これらの相同配列と本発明のポリペプチドとは発現部位が異なることから、異なる機能を有していると考えられた。即ち、小腸に高発現し、VIP切断活性を有するプロテアーゼ及びその前駆体である本発明のポリペプチドは本発明者らが初めて見出したものである。

図面の簡単な説明

図1は、組換え体蛋白質精製酵素活性を検出した図である。

図2は、緩衝液コントロールによるVIP切断のHPLC分析を示す図である。

図3は、酵素試料によるVIP切断のHPLC分析を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明で使用する用語につき説明する。

本明細書中で使用される「前駆体」は「酵素前駆体」を示しており、これ自体では不活性型であるが、活性化（プロセッシング）を受けて活性型酵素となる蛋白質を表す。「成熟体」は、活性化を受けて活性型となった酵素である蛋白質を表す。「プロテアーゼ活性」は、ペプチド結合の加水分解を触媒する活性であり、主として活性型酵素（成熟体）の示す酵素活性を表す。

本発明のポリペプチドには、

（１）配列番号２で表されるアミノ酸配列における第２３７番～第５３１番のアミノ酸配列からなるポリペプチド（以下、「ポリペプチド２３７／５３１」と称することがある）；

（２）配列番号２で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

（３）配列番号２で表されるアミノ酸配列における第５１番～第５３１番のアミノ酸配列からなるポリペプチド（以下、「ポリペプチド５１／５３１」と称することがある）（以下、（２）及び（３）をあわせて「本発明の前駆体」と称することがある）；

（４）配列番号２で表されるアミノ酸配列における第２３７番～第５３１番のアミノ酸配列を含み、かつ、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド（以下、「ポリペプチド２３７／５３１の機能的等価改変体」と称することがある）；

（５）配列番号２で表されるアミノ酸配列における第５１番～第５３１番のアミノ酸配列を含み、かつ、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド（以下、「ポリペプチド５１／５３１の機能的等価改変体」と称することがある）

（６）配列番号２で表されるアミノ酸配列における第１番～第５０番のアミノ酸配列、あるいは配列番号２で表されるアミノ酸配列における第１番～第５０番のアミノ酸配列の１～１０個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入された配列を含むアミノ酸配列のＣ末端側に、配列番号２で表されるアミノ酸配列における第５１番～第５３１番のアミノ酸配列が連結されたアミノ酸配列を含み、かつ、プロテアーゼ活性を示す酵素の前駆体であるポリペプチド。（以下、（５）及び（６）を「本発明の前駆体の機能的等価改変体」と称する）；及び

（７）ポリペプチド２３７／５３１を含み、かつ、配列番号２で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は、ポリペプチド５１／５３１のアミノ酸配列

との相同性が95%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示す酵素の前駆体であるポリペプチド（以下、「本発明の相同ポリペプチド」と称する）

が含まれる。

「ポリペプチド237/531の機能的等価改変体」および「本発明の前駆体の機能的等価改変体」を総称して「本発明の機能的等価改変体」と称するが、

「本発明の機能的等価改変体」としては、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第237番～第531番のアミノ酸配列を含み、かつ、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド」、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第51番～第531番のアミノ酸配列を含み、かつ、プロテアーゼ活性を示すポリペプチド」、あるいは「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第50番のアミノ酸配列、あるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第50番のアミノ酸配列の1～10個、好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入された配列を含むアミノ酸配列のC末端側に、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第51番～第531番のアミノ酸配列が連結されたアミノ酸配列を含み、かつ、プロテアーゼ活性を示す酵素の前駆体であるポリペプチド」が含まれるが、各本発明の機能的等価改変体のうち、小腸に高発現されるポリペプチドが好ましい。また、本発明の機能的等価改変体には、本発明のポリペプチド、例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、ポリペプチド51/531、又はポリペプチド237/465のN末端及び／又はC末端に、適当なマーカ配列等を付加したポリペプチド（すなわち、融合ポリペプチド）も、プロテアーゼ活性を示すか、あるいは、プロセッシングを受けた後にプロテアーゼ活性を示す限り含まれる。

前記マーカ配列としては、ポリペプチドの発現の確認、細胞内局在の確認、あるいは、精製等を容易に行なうための配列を用いることができ、例えば、FLAGエピトープ、ヘキサヒスチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げることができる。

本発明の機能的等価改変体の起源はヒトに限定されない。例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第237番～第531番のアミノ酸配列を含む

ポリペプチド、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第51番～第531番のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのヒトにおける変異体が含まれるだけでなく、ヒト以外の生物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）由来の機能的等価改変体が含まれる。更には、それらの天然ポリペプチド（すなわち、ヒト由来の変異体、又はヒト以外の生物由来の機能的等価改変体）又は、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第237番～第531番のアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第51番～第531番のアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを元にして遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドなどが含まれる。なお、本明細書において「変異体」（variation）とは、同一種内の同一ポリペプチドにみられる個体差、あるいは、数種間の相同ポリペプチドにみられる差異を意味する。

「本発明の相同ポリペプチド」は、「ポリペプチド237／531を含み、かつ、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は、ポリペプチド51／531のアミノ酸配列との相同性が95%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、プロテアーゼ活性を示す酵素の前駆体であるポリペプチド」である限り、特に限定されるものではないが、該相同性が、好ましくは98%以上であるアミノ酸配列を含むことができ、また、各相同ポリペプチドのうち、小腸に高発現されるポリペプチドが好ましい。

なお、本明細書における前記「相同性」とは、BLASTパッケージ[sgi32bit版、バージョン2.0.12;National Center for Biotechnology Information(NCBI)より入手]のbl2seqプログラム(Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden, FEMS

Microbiol. Lett., 174, 247-250, 1999)を用いて得られた値Identitiesを意味する。

なお、パラメーターでは、ペアワイズアラインメントパラメーターとして、

「プログラム名」として「blastp」を、「Gap挿入Cost値」を「0」で、「Gap伸長Cost値」を「0」で、「Matrix」として「BLOSUM62」をそれぞれ使用する。

以上、本発明のポリペプチドについて説明したが、本発明のポリペプチドのうち、配列番号2で表されるアミノ酸からなるポリペプチドである蛋白質を「ARS

蛋白質」と称する。配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドはARS蛋白質全長ORFであり、ポリペプチド51／531は細胞外領域であり、いずれも酵素の前駆体に関するものである。また、ポリペプチド237／531はセリンプロテアーゼ領域およびC末端配列であると推定される。後述の実施例に示すように配列番号2に記載の酵素前駆体は、酵素分解的にN末端領域をプロセッシングし、成熟体（活性型酵素）となった結果、酵素活性が増強することが明らかとなっている。また同様に、細胞外領域（ポリペプチド51／531）も活性型酵素を得る為に用いることができる。セリンプロテアーゼ領域およびC末端配列であると推定されるポリペプチド237／531は、酵素活性が観察されたことから、該領域を有すれば酵素活性を示すことが確認された。

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする限り、特に限定されるものではなく、例えば、配列番号1で表される塩基配列、配列番号1で表される塩基配列における第151番～第1593番の塩基配列、あるいは、配列番号1で表される塩基配列における第709番～第1593番の塩基配列からなるポリヌクレオチドを挙げることができる。配列番号1で表される塩基配列からなる前記ポリヌクレオチドは配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする。また、配列番号1で表される塩基配列における第151番～第1593番の塩基からなる前記ポリヌクレオチドは、ポリペプチド51／531を、配列番号1で表される塩基配列における第709番～第1593番の塩基からなる前記ポリヌクレオチドは、ポリペプチド237／531をコードする。

本発明のポリヌクレオチドは、当業者であれば、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、ポリペプチド51／531、またはポリペプチド237／531をコードする塩基配列（例えば、配列番号1で表される塩基配列、配列番号1で表される塩基配列における第151番～第1593番の塩基からなる配列または配列番号1で表される塩基配列における第709番～第1593番の塩基からなる配列）の情報を基にして、取得することができる。なお、遺伝子組換え技術については、特に断りがない場合、公知の方法（例えば、Sambrook, Jら, “Molecular Cloning—A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor

Laboratory, NY, 1989等の遺伝子操作実験マニュアル)に従って実施することが可能である。

例えば、配列番号1で表される塩基配列、配列番号1で表される塩基配列における第151番～第1593番の塩基からなる配列、または配列番号1で表される塩基配列における第709番～第1596番の塩基からなる配列の情報を基にして適当なプライマー又はプローブを設計し、前記プライマー又はプローブと、目的とする生物[例えば、哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ)]由来の試料(例えば、総RNA若しくはmRNA画分、cDNAライブラリー、又はファージライブラリー)とを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法(Saiki, R. K. ら, Science, 239, 487-491, 1988)又はハイブリダイゼーション法を実施することにより、ポリヌクレオチドを取得できる。そのポリヌクレオチドを適当な発現系(例えば、実施例7に記載の方法)を用いて発現させることにより本発明のポリペプチドが得られる。例えば、実施例8又は実施例11に記載の方法により、該ポリペプチドまたは該ポリペプチドがプロセッシングを受けて生成した成熟体がプロテアーゼ活性を示すことを確認できる。

また、前記の遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドは、常法、例えば、部位特異的突然変異誘発法(site-specific mutagenesis; Mark, D. F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984)により、ポリヌクレオチドを取得し、該ポリヌクレオチドを適当な発現系を用いて発現させ、発現したポリペプチドまたは該ポリペプチドがプロセッシングを受けて生成した成熟体が、例えば、実施例8又は実施例11に記載の方法により、プロテアーゼ活性を示すことを確認することにより、所望のポリペプチドを取得することができる。

本発明のポリペプチドには、本発明の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを適当な発現系を用いて発現させることにより得られる、活性化に伴う切断を受けたポリペプチドもプロテアーゼ活性を示す限り含まれる。好ましくは、配列番号2で表されるアミノ酸配列におけるセリンプロテアーゼの活性化配列の間、即ち、第236番目と第237番目のアミノ酸の間が切断されて生成した、セリンプロテアーゼ活性を有する、N末端が第237番目のアミノ酸であるポリペプチド(すなわち、ポリペプチド237/531であると推定される)である。

また、本発明のポリペプチドには、本発明の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを適当な発現系を用いて発現させることにより得られた蛋白質を好ましくは実施例9に記載の方法によりトリプシン処理して得られる、活性化に伴う切断を受けたポリペプチドもプロテアーゼ活性を示す限り含まれる。

本明細書において、あるポリペプチドが「プロテアーゼ活性」を示すか否かは、特に限定されるものではないが、蛍光標識された合成ペプチド、例えばMCA (4-Methyl-Coumaryl-7-Amide) でC末端を標識された合成ペプチドを用いて酵素切断活性を検出することにより確認することができ (Yasuoka, S. et al., Am. J. Respir. Cell Mol Biol., 16, 300-308, 1997)、より好ましくは、実施例8又は実施例11に記載の方法により確認することができる。更に好ましくは、生理活性物質であるVIPを用いて例えば実施例12に記載の方法により酵素切断活性を検出し確認することができる。

本発明のポリヌクレオチドの製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、(1) PCR を用いた方法、(2) 常法の遺伝子工学的手法 (すなわち、cDNA ライブラリーで形質転換した形質転換株から、所望の cDNA を含む形質転換株を選択する方法) を用いる方法、又は (3) 化学合成法などを挙げることができる。各製造方法については、W001/34785 に記載されていると同様に実施できる。ただし、上記特許出願明細書における「本発明の新規蛋白」を本発明のポリペプチド、「本発明の遺伝子」を本発明のポリヌクレオチドと読み替える。

以下、各製造方法について、順次、説明する。

PCRを用いた方法では、例えば、以下の手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドを産生する能力を有するヒト細胞又は組織からmRNAを抽出する。次いで、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に基づいて、本発明のポリペプチドに相当するmRNAの全長を挟むことのできる2個1組のプライマーセット、あるいは、その一部のmRNA領域を挟むことのできる2個1組のプライマーセットを作成する。変性温度又は変性剤添加条件などを適宜選択し、作成した各々のプライマーセットに適した逆転写酵素ーポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を行なうことにより、本発明のポリペプチド

の全長cDNA又はその一部を得ることができる。

あるいは、本発明のポリペプチドを産生する能力を有するヒト細胞又は組織から調製したmRNAから逆転写酵素により作製したcDNA、あるいは、市販のヒト細胞又は組織由来のcDNAを鋳型として、PCRを行なうことにより、本発明のポリペプチドの全長cDNA又はその一部を得ることができる。

より詳細には、まず、本発明のポリペプチドの産生能力を有する細胞又は組織から、本発明のポリペプチドをコードするmRNAを含む総RNAを既知の方法により抽出する。抽出法としては、例えば、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法、又はグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法等を挙げることができるが、グアニジン・チオシアネート塩化セシウム法を用いることが好ましい。本発明のポリペプチドの産生能力を有する細胞又は組織は、例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその一部を用いたノーザンブロッティング法、あるいは、本発明のポリペプチドに特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティング法などにより特定することができる。

続いて、抽出したmRNAを精製する。mRNAの精製は常法に従えばよく、例えば、mRNAをオリゴ（dT）セルロースカラムに吸着後、溶出させることにより精製することができる。所望により、ショ糖密度勾配遠心法等によりmRNAを更に分画することもできる。また、mRNAを抽出しなくても、市販されている抽出精製済みのmRNAを用いることもできる。

次に、精製されたmRNAを、例えば、ランダムプライマー、オリゴdTプライマー、及び／又はカスタム合成したプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行ない、第1鎖cDNAを合成する。この合成は、常法によって行なうことができる。得られた第1鎖cDNAを用い、目的ポリヌクレオチドの全長又は一部の領域を挟んだ2種類のプライマーを用いてPCRを実施し、目的とするcDNAを増幅することができる。得られたDNAをアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、前記DNAを制限酵素等で切断し、接続することによって目的とするDNA断片を得ることができる。

常法の遺伝子工学的手法を用いる方法では、例えば、前記特許文献の「発明の

実施の形態」 1) 蛋白質遺伝子の製造方法 b) 第2製造法に記載された手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

化学合成法を用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」 1) 蛋白質遺伝子の製造方法 c) 第3製造法、d) 第4製造法に記載された方法によって、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。より具体的には、化学合成法によって製造したヌクレオチド断片を結合することによっても製造できる。また、各ポリヌクレオチド（オリゴヌクレオチド）は、DNA合成機（例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer（ベックマン社）、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer（アプライドバイオシステムズ社）など）を用いて合成することができる。

本発明の発現ベクター、宿主細胞、蛋白質の製造方法は、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」 2) 本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の組換え蛋白の製造方法に記載された方法により実施できる。単離された本発明のポリヌクレオチドを、適当なベクターDNAに再び組込むことにより、真核生物又は原核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。また、これらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞においてポリヌクレオチドを発現させることが可能である。

本発明の発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、本発明のポリヌクレオチドを挿入することにより得られる発現ベクターを挙げることができる。

また、本発明の細胞も、本発明の前記発現ベクターでトランスフェクションされ、本発明のポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、本発明のポリヌクレオチドが、宿主細胞の染色体に組み込まれた細胞であることもできるし、あるいは、本発明によるポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形で含有する細胞であることもできる。また、本発明のポリペプチドを発現している細胞であることもできるし、あるいは、本発明のポリペプチドを発現していない細胞であることもできる。本発明の細胞は、例えば、本発明の発現ベクターにより、所望の宿主細胞をトランスフェクションすることにより得ることがで

きる。より具体的には、例えば、実施例 3、実施例 4、実施例 5、及び実施例 6 に記載のように本発明のポリヌクレオチドをほ乳類動物細胞用の発現ベクター pCEP4dE2-FLAG (WO 01/34785 実施例 3) に組み込むことにより、所望の蛋白質の発現ベクターを得ることができ、該発現ベクターを市販のトランスフェクション試薬 FuGENE™6 を用いてヒト胎児腎臓由来 HEK293-EBNA 細胞に取り込ませて本発明の形質転換細胞を製造することができる。

上記で得られる所望の形質転換細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により本発明の蛋白質が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記 293-EBNA 細胞であれば牛胎児血清 (FBS) 等の血清成分を添加したダルベッコ修飾イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地に G418 を加えたものを使用できる。

上記により、形質転換細胞に生産される本発明の蛋白質は、該蛋白質の物理的性質や生化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、分離・精製することができる。

本発明の蛋白質はマーカ配列とインフレーションで融合して発現させることで、該蛋白質の発現の確認、精製等が可能になる。マーカ配列としては、例えば、FLAG エピトープ、ヘキサ・ヒスチジンタグ、ヘマグルチニンタグ、myc エピトープなどがある。また、マーカ配列と該新規蛋白の間にエンテロキナーゼ、ファクター Xa、トロンビンなどのプロテアーゼが認識する特異的なアミノ酸配列を挿入することにより、マーカ配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。

<本発明のスクリーニング方法>

本発明のスクリーニングに用いるポリペプチドとしては、後述の実施例 2 に示すように小腸において高発現している蛋白質であり、かつ実施例 8、実施例 11、又は実施例 12 に示すようにプロテアーゼ活性を有するものが望ましい。実施例 12 に示すように本発明のスクリーニングに用いるポリペプチドの 1 つである、ポリペプチド 51/531 をコードするポリヌクレオチドを発現させることにより得られる活性化に伴う切断を受けたポリペプチドは VIP を切断することがわかった。

背景技術の欄で述べたように、VIPは便秘症、特に女性患者数の多い便秘型の過敏性腸症候群の治療及び炎症性の消化管疾患の治療に有用であることが知られている生理活性ペプチドである。本発明のスクリーニングに用いるポリペプチドがVIPを切断したことから、本発明のスクリーニングに用いるポリペプチドを用いてその阻害剤をスクリーニングすることにより、内在性のVIP量を増加させることで消化管疾患、特に過敏性腸症候群を改善する物質が得られる。

本発明のスクリーニング法は、特に限定されるものではないが、蛍光標識された合成ペプチド、例えばMCA (4-Methyl-Coumaryl-7-Amide)でC末端を標識された合成ペプチドを用いて酵素切断活性を検出することにより実施することができ(Yasuoka, S. et al., Am. J. Respir. Cell Mol Biol., 16, 300-308, 1997)、より好ましくは、実施例8又は実施例11に記載の方法により実施することが出来る。また、実施例12に示すように生理活性ペプチド(例えばVIP)を基質として酵素反応を行った後、HPLCによる分析により酵素活性を判断し、酵素の阻害剤をスクリーニングすることができる。

例えば実施例8に記載の条件で、 $IC_{50}=10\mu M$ 以下の物質を、好ましくは $IC_{50}=1\mu M$ 以下の物質を、更に好ましくは $IC_{50}=0.1\mu M$ 以下の物質をプロテアーゼ阻害活性を有する物質として選択することができる。また、このようにプロテアーゼ阻害活性を有する物質を選択することによって消化管疾患治療薬、特に過敏性腸症候群の治療薬を得ることができる。

本発明のスクリーニング法で使用する試験物質としては、特に限定されるものではないが、例えば、市販の化合物(ペプチドを含む)、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物(ペプチドを含む)、コンビナトリアル・ケミストリー技術(N. K. Terrett, M. Gardner, D. W. Gordon, R. J. Kobylecki, J. Steele, Tetrahedron, 51, 8135-73(1995))によって得られた化合物群、微生物の培養上清、植物や海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物、あるいは、本発明のスクリーニング法により選択された化合物(ペプチドを含む)を化学的又は生物学的に修飾した化合物(ペプチドを含む)を挙げることができる。

<本発明の消化管疾患治療用医薬組成物の製造方法>

本発明には、本発明のスクリーニング方法を用いてスクリーニングする工程、及び前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程を含むことを特徴とする、消化管疾患治療用医薬組成物の製造方法が包含される。

本発明のスクリーニング方法により得られる物質を有効成分とする製剤は、前記有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体、賦形剤、及び／又はその他の添加剤を用いて調製することができる。

投与としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、又は経口用液剤などによる経口投与、あるいは、静注、筋注、若しくは関節注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、又は経粘膜投与剤などによる非経口投与を挙げることができる。特に胃で消化されるペプチドにあつては、静注等の非経口投与が好ましい。

経口投与のための固体組成物においては、1又はそれ以上の活性物質と、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、又はメタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合することができる。前記組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、又は溶解若しくは溶解補助剤などを含有することができる。錠剤又は丸剤は、必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆することができる。

経口のための液体組成物は、例えば、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、又はエリキシル剤を含むことができ、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば、精製水又はエタノールを含むことができる。前記組成物は、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、又は防腐剤を含有することができる。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性若しくは非水性の溶液剤、懸濁剤、又は乳濁剤を含むことができる。水溶性の溶液剤又は懸濁剤には、希釈剤として、例えば、注射用蒸留水又は生理用食塩水などを含むことができる。非水溶性の溶液剤又は懸濁剤の希釈剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油）、アルコール類（例えば、エタノール）を含むことができる。

ール)、又はポリソルベート80等を含むことができる。前記組成物は、更に湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解若しくは溶解補助剤、又は防腐剤などを含むことができる。前記組成物は、例えば、バクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、又は照射によって無菌化することができる。また、無菌の固体組成物を製造し、使用の際に、無菌水又はその他の無菌用注射用媒体に溶解し、使用することもできる。

投与量は、有効成分、すなわち本発明のスクリーニング方法により得られる物質の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、又は性別等を考慮して、適宜決定することができる。

例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重60kgとして）において、1日につき約0.1～100mg、好ましくは0.1～50mgである。非経口投与の場合、注射剤の形では、1日につき0.01～50mg、好ましくは0.01～10mgである。

実施例

以下に実施例により本発明を詳述するが、本発明は該実施例によって限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法(Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989等)の実験マニュアルに従った。

また、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って実施可能である。

(実施例1) ARS の全長 ORF 配列の決定

ヒト小腸由来の cDNA (Marathon-Ready™ cDNA ; クロンテック社) を鋳型とし、cDNA 末端増幅 PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends、RACE) を繰り返すことにより、5' 側および 3' 側の塩基配列を解読し、新規遺伝子配列の全長のオープンリーディングフレーム(open reading frame、ORF) 配列を決定した。以下に、詳細を記した。5' RACE にはプライマーとして GSPR1～10 を用いた。GSPR1 (配列番号 5) と AP-1 (Marathon-Ready™ cDNA 添付品 ; クロンテック社) (配列番号 3) を 1stPCR プライマー、ヒト小腸由来の cDNA (Marathon-Ready™ cDNA ; クロンテ

ック社)を鋳型とし、DNA ポリメラーゼ(TaKaRa LA Taq™; 宝酒造社)を用いて PCR を行なった。前記 PCR では、最初に 97°C(2 分間)で熱変性を行なった後、97°C20 秒、60°C30 秒、72°C2 分のサイクルを 40 回、72°C7 分の条件で PCR をおこなった。続いて、反応液のアガロースゲル電気泳動をおこなった。DNA の増幅を確認した、先の PCR 反応液を滅菌水で 50 倍に希釈したものを、2nd PCR のテンプレートとし、GSPR-2 (配列番号 6) と AP-2 (Marathon-Ready™ cDNA 添付品; クロンテック社) (配列番号 4) をプライマー、DNA ポリメラーゼ(Pyrobest™ DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、96°C2 分半の後、97°C20 秒、68°C30 秒、72°C60 秒のサイクルを 40 回、続いて 72°C7 分の条件で PCR をおこなった。こうして増幅された遺伝子を直接、ジデオキシターミネーター法により DNA シークエンサー (ABI3700 DNA Sequencer; アプライドバイオシステムズ社)を用いて配列解析した。[GSPR3 (配列番号 7) と GSPR4 (配列番号 8)]、[GSPR5 (配列番号 9) と GSPR6 (配列番号 10)]、[GSPR7 (配列番号 11) と GSPR8 (配列番号 12)]、及び [GSPR9 (配列番号 13) と GSPR10 (配列番号 14)] のそれぞれ 2 本ずつの組み合わせについても同様に AP-1 とセットで 1stPCR、AP-2 とセットで 2ndPCR をおこない、5' 側の配列を決定していった。また、3' 側の遺伝子配列についても 5' 側同様に 1st3' RACE のプライマーとして GSPF1 (配列番号 15) と AP-1、を用い、前記 cDNA をテンプレートとし、DNA ポリメラーゼ(TaKaRa LA Taq™; 宝酒造社)を用い 97°C(2 分間)で熱変性を行なった後、97°C20 秒、60°C30 秒、72°C2 分のサイクルを 40 回、72°C7 分の条件で PCR をおこなった。反応液のアガロースゲル電気泳動をおこない、DNA の増幅を確認した後、先の PCR 反応液を滅菌水で 50 倍に希釈したものを、2nd PCR のテンプレートとし、GSPR-2 (配列番号 16) と AP-2 をプライマー、DNA ポリメラーゼ(Pyrobest™ DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、96°C2 分半の後、97°C20 秒、68°C30 秒、72°C60 秒のサイクルを 40 回、続いて 72°C7 分の条件で PCR をおこなった。こうして増幅された遺伝子を直接、ジデオキシターミネーター法により DNA シークエンサー (ABI3700 DNA Sequencer; アプライドバイオシステムズ社)を用いて配列解析することで 3' 側の ORF を決定し、全 ORF を決定した。そしてこの遺伝子を ARS と名付けた。該遺伝子の全長塩基配列を配列番号 1 に、推定アミノ酸配列を配列番号 2 に示した。

ARS の ORF は、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 1 番から第 531 番までの 531 アミノ酸からなる新規蛋白質をコードしており、ホモロジー検索の結果、そのドメイン構造は N 末から、細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、プロ領域、プロテアーゼ活性化配列、セリンプロテアーゼドメイン、C 末端配列であり、II 型膜貫通セリンプロテアーゼファミリーに属する分子であった。

(実施例 2) ARS 遺伝子の組織発現分布

市販の cDNA パネル (Human MTC Panel I、Human MTC Panel II、Human Fetal MTC Panel、及び Human Tumor MTC Panel ; クロンテック社) を用いて、ARS 遺伝子の組織発現分布を以下の手順で解析した。

すなわち、配列番号 17 と配列番号 19 とで表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとし、前記 cDNA パネルを鋳型として、DNA ポリメラーゼ (TaKaRa LA Taq™ ; 宝酒造社) を用いて PCR を行なった。前記 PCR では、最初に 96°C (2 分間) で熱変性を行なった後、97°C20 秒、60°C30 秒、72°C2 分のサイクルを 40 回、72°C7 分の条件で PCR をおこなった。続いて、反応液のアガロースゲル電気泳動を行ない、ARS 遺伝子の mRNA に由来する約 1.5kbp の DNA 断片を検出した。その結果、ARS 遺伝子の mRNA は、小腸において強発現しており、肺、大腸、及び脾臓ではほとんど発現していないことが判明した。

(実施例 3) 新規 II 型膜貫通セリンプロテアーゼ遺伝子 ARS 全長 ORF 遺伝子のクローニング

配列番号 18 と配列番号 19 で示されるオリゴ DNA とをプライマーとし、ヒト小腸由来の cDNA (Marathon-Ready™ cDNA ; クロンテック社) を鋳型として、DNA ポリメラーゼ (Pyrobest™ DNA polymerase ; 宝酒造社) を用いて、96°C2 分半の後、97°C20 秒、60°C30 秒、72°C2 分のサイクルを 45 回、続いて 72°C7 分の条件で PCR を行なった。こうして生成した約 1.5 kbp の断片をクローニングベクター

(pCR4Blunt-TOPO ; インビトロジェン社) にアンピシリン耐性を指標にサブクローニングし、プラスミドクローンを制限酵素 EcoRI 処理した場合に、クローニングベクターのクローニング部位両側に存在する EcoRI 認識配列により切断され、

約 1.5 k b のインサート配列が生成するプラスミドクローン pPCR617-5' F を選択した。ここで得られたプラスミドクローン pPCR617-5' F を鋳型にし、5' 側に XbaI 認識配列およびコザック (Kozak) 配列が付加された配列番号 20 と配列番号 19 で示されるオリゴ DNA とをプライマーとし、DNA ポリメラーゼ (Pyrobest™ DNA polymerase ; 宝酒造社) を用いて、95°C2 分半の後、97°C20 秒、60°C30 秒、72°C2 分のサイクルを 40 回、続いて 72°C7 分の条件で PCR を行った。こうして生成した約 1.5 kbp の断片をクローニングベクター (PCR4Blunt-TOP0 ; インビトロジェン社) に、アンピシリン耐性を指標にサブクローニングし、プラスミドクローンを制限酵素 EcoRI 処理した場合にクローニングベクターのクローニング部位の両側に存在する EcoRI 認識配列が切断され、約 1.5 k b のインサート配列が生成するプラスミドクローン pCR617-XbaF1 を選択した。また、配列番号 21 と 3' 側に NotI 認識配列が付加された配列番号 22 で示されるオリゴ DNA とをプライマー、ヒト小腸由来の cDNA (Marathon-Ready™ cDNA ; クロンテック社) を鋳型、DNA ポリメラーゼ (Pyrobest DNA polymerase ; 宝酒造社) を用いて、96°C2 分半の後、97°C20 秒、60°C30 秒、72°C30 秒のサイクルを 40 回、続いて 72°C7 分の条件で PCR を行った。(1) こうして生成した約 0.6 kbp の断片をフェノール/クロロホルム処理後、増幅配列中に存在する ApaI 認識配列とプライマー部位に挿入した NotI 認識配列を利用し、制限酵素 ApaI、NotI で切断して得られた約 0.6 kbp の DNA 断片と、(2) 先に取得した pCR617-XbaF1 のインサート内に存在する ApaI 認識配列とサブクローニングの際にプライマー部位に挿入した XbaI 認識配列とを利用し、制限酵素 XbaI、ApaI で切断して得られた約 1kbp の DNA 断片とを連結させ、pCEP4dE2-FLAG (WO 01/34785 実施例 3) の XbaI、NotI 部位に挿入して、全長蛋白質発現プラスミド pCEP-ARSF-FLAG を完成した。pCEP4dE2-FLAG に挿入された配列をジデオキシターミネーター法により DNA シークエンサー (ABI3700 DNA Sequencer ; アプライドバイオシステムズ社) を用いて配列解析したところ、配列番号 1 の 1 番から 1593 番で表される塩基配列であることが確認された。

この発現プラスミド pCEP-ARSF-FLAG は配列番号 2 の 1 番から 531 番にコードされるポリペプチドの C 末端に FLAG 配列が付加された蛋白質を発現させることができる。

(実施例 4) ARS 細胞外領域蛋白質発現プラスミドの構築

配列番号 2 の 51 番から 531 番にコードされるポリペプチドを N 末端に分泌シグナル配列、FLAG を付加した蛋白質として発現するためのプラスミドを以下のよう

に構築した。

まず、配列番号 1 の 151 番から 1596 番の遺伝子を PCR により取得した。詳しくは、BglII 認識配列が付加された配列番号 23 と XhoI 認識配列が付加された配列番号 24 で示されるオリゴ DNA をプライマー、鋳型として pCEP-ARS-FLAG、DNA ポリメラーゼ (Pyrobest™ DNA polymerase ; 宝酒造社) を用いて、96℃2 分の後、98℃15 秒、65℃30 秒、72℃1 分 30 秒のサイクルを 36 回、続いて 72℃7 分の反応を行った。こうして生成した DNA 断片を pCR4Blunt-TOPO ベクター (インビトロジェン社製) にサブクローニングし、ジデオキシターミネーター法により DNA シークエンサー (ABI3700 DNA Sequencer ; アプライドバイオシステムズ社) を用いて配列を確認した。BglII、XhoI 部位で目的の DNA 断片を切り出し、pCEP-signal-FLAG ベクターの BamHI、XhoI 部位に挿入し pCEP-signal-FLAG-ARS-extracellular を完成させた。

この発現プラスミド pCEP-signal-FLAG-ARS-extracellular は配列番号 2 の 51 番から 531 番にコードされるポリペプチドの N 末端に分泌シグナル配列、FLAG 配列が付加された蛋白質を発現させることができる。

(実施例 5) ARS のセリンプロテアーゼドメインおよび C 末端配列発現プラスミドの構築

配列番号 2 の 237 番から 531 番にコードされるポリペプチドを N 末端に分泌シグナル配列、FLAG を付加した蛋白質として発現するためのプラスミドは以下のよう

に構築した。

まず、配列番号 1 の 709 番から 1596 番の遺伝子を PCR により取得した。詳しくは、BglII 認識配列が付加された配列番号 25 と配列番号 24 で示されるオリゴ DNA プライマー、鋳型として pCEP-ARS-FLAG、DNA ポリメラーゼ (Pyrobest™ DNA polymerase ; 宝酒造社) を用いて、96℃2 分の後、98℃15 秒、65℃30 秒、72℃1

分のサイクルを 35 回、続いて 72°C 7 分の反応を行った。こうして生成した DNA 断片を制限酵素 BglIII および XhoI で切断した後、pCEP4-signal-FLAG ベクターの BamHI、XhoI 部位に挿入し pCEP-signal-FLAG-ARS-SerPD を完成させた。ジデオキシターミネーター法により DNA シークエンサー (ABI3700 DNA Sequencer ; アプライドバイオシステムズ社) を用いて配列解析したところ、配列番号 1 で表される塩基配列の 709 番から 1596 番の塩基からなる配列であることが確認された。

この発現プラスミド pCEP-signal-FLAG-ARS-SerPD は配列番号 2 の 237 番から 531 番にコードされるポリペプチドの N 末端に分泌シグナル配列、FLAG 配列が付加された蛋白質を発現させることができる。

(実施例 6) ARS のセリンプロテアーゼドメイン発現プラスミドの構築

配列番号 2 の 237 番から 464 番にコードされるポリペプチドを N 末端に分泌シグナル配列、FLAG を付加した蛋白質として発現するためのプラスミドは以下のよう

に構築した。

まず、配列番号 1 の 709 番から 1392 番の遺伝子を PCR により取得した。詳しくは、BglIII 認識配列が付加された配列番号 25 と、XhoI 認識配列及び終止コード配列が付加された配列番号 26 で示されるオリゴ DNA をプライマーとし、鋳型及び PCR 条件は実施例 5 と同様にして PCR を行った。生成した DNA 断片を制限酵素 BglIII および XhoI で切断した後、pCEP4-signal-FLAG ベクターの BamHI、XhoI 部位に挿入し pCEP-signal-FLAG-ARS-SerPD0 を完成させた。ジデオキシターミネーター法により DNA シークエンサー (ABI3700 DNA Sequencer ; アプライドバイオシステムズ社) を用いて配列解析したところ、配列番号 1 で表される塩基配列の 709 番から 1392 番の塩基からなる配列であることが確認された。

この発現プラスミド pCEP-signal-FLAG-ARS-SerPD0 は配列番号 2 の 237 番から 464 番にコードされるポリペプチドの N 末端に分泌シグナル配列、FLAG 配列が付加された蛋白質を発現させることができる。

(実施例 7) ARS-FLAG、signal-FLAG-ARS-extracellular、signal-FLAG-ARS-SerPD、signal-FLAG-ARS-SerPD0 の動物細胞株での発現

実施例3～5において作製した発現プラスミドをトランスフェクション試薬 (FuGENE™6 Transfection Reagent ; ロシュ社) を用いて添付指示書に従い HEK293-EBNA細胞 (インビトロジェン社) に導入した。プラスミド導入後12-16時間で培地を無血清に置換した後、さらに48-60時間培養を継続し、培養上清を回収し、得られた各培養液を、遠心分離器 (8800型 ; 久保田製作所社) により遠心分離 (3000rpm, 10分間) することにより、培養上清を得た。また、前記培養上清を除去した後に残った細胞を、リン酸緩衝液 (PBS : 10mMリン酸ナトリウム、pH 7.5) にて洗浄後、リン酸緩衝液にてピペティングにより細胞を培養プレートより剥離したものを遠心分離器 (8800型遠心分離器 ; 久保田製作所社) にて 3000rpm、10分の遠心分離した沈殿をリン酸緩衝液に懸濁させたものを細胞画分とした。pCEP-ARSF-FLAG、pCEP-signal-FLAG-ARS-extracellular、pCEP-signal-FLAG-ARS-SerPDを導入して得られてた遠心分離処理後の培養上清を以下、各々 ARSF-FLAG培養上清、signal-FLAG-ARS-extracellular培養上清、signal-FLAG-ARS-SerPD培養上清、signal-FLAG-ARS-SerPD0培養上清と称する。

培養上清中並びに細胞内に目的蛋白が存在することを末端に付加したFLAGタグに対する抗体 (マウス抗FLAGモノクローナル抗体M2 ; シグマ社) を用いたウエスタンブロッティングで確認した。すなわち、上記培養上清 (15cmシャーレ1枚より回収した培養上清12ml中20μl) 並びに細胞画分 (15cmシャーレ1枚より回収した細胞を10mlのリン酸緩衝液に懸濁させた細胞画分5μl) をSDS/4% ~20% アクリルアミドゲル (第一化学薬品社) で電気泳動 (還元条件) 後、ブロッティング装置を用いてPVDF膜 (ミリポア社) に転写した。転写後のPVDF膜にブロックエース (大日本製薬社) を添加してブロッキングした後、ビオチン化マウス抗FLAGモノクローナル抗体 (M2 ; シグマ社) 、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (アマシャムファルマシア社) を順次反応させた。反応後、ECLウエスタンブロッティング検出システム (アマシャムファルマシア社) を用いて目的蛋白の発現を確認した。ARS-FLAGを発現させた場合、細胞画分に予想分子量約55-60kDの全長タンパクと考えられるバンドが検出されたほか、約35-40kDの蛋白が検出された。また培養上清中にも空ベクターを導入した場合には検出されない分子量約55-60kDと35-40kDのバンドが検出された。培養上清中と比べ、

細胞画分中に少なくとも約10倍以上の発現蛋白が検出され、大部分の発現蛋白は細胞内に留まっていることが確認されると共に、ARS遺伝子産物はセリンプロテアーゼファミリーに保存されたプロ領域とセリンプロテアーゼドメインの間にある活性化配列で切断されて成熟体となるものがあり、切断された場合でも大部分はシステイン間のS-S結合等により細胞外に放出されないでいることが示唆された。一方、signal-FLAG-ARS-extracellularを発現させた細胞では細胞画分に約50-60kD、約23-25kD、約20-23kDのバンドが検出され、同様のバンドは培養上清中でも確認された。またsignal-FLAG-617-SerPDを発現させた細胞では細胞画分に分子量約30-35kD、約27kD、約24kDのバンドが検出され、培養上清中には主として35-37kDのバンドが検出された。signal-FLAG-ARS-SerPD0を発現させた細胞では細胞画分に分子量約25-28kD、約24kD、約23kDのバンドが検出され、培養上清中には主として約25-28kDのバンドが検出され、それぞれの蛋白の発現が確認された。

セリンプロテアーゼが活性化するとき切断されることが知られている活性化部位(小出武比古、医学の歩み、198, 11-16, 2001)がARSにも存在する(配列2で示した236番アルギニンと237番イソロイシン)ことからこの間で切断され、さらにそのN端側で少なくとも1箇所切断されと考えられる。また、既知のⅡ型セリンプロテアーゼHAT(Yamaoka, K. et al., J. Biol. Chem. 273, 11895-11901, 1998), Desc1 (Lang, J. C. and Schuller, D. E., British J. Cancer, 84, 237-243, 2001), hepsin (Leytus, S. P. et al., Biochemistry, 27, 1067-1074, 1988), Spinesin (TMPRSS5) (Nozomi Yら, J. Biol. Chem. 2776806-6812, 2002) とのアミノ酸配列の比較から、ジスルフィド結合を形成すると推定されているシステイン残基がARSでも保存されている(Cys225、346、262、278、392、406、417、446) ことから約26kDのセリンプロテアーゼドメインを含むポリペプチドとN端側のポリペプチドがジスルフィド結合を形成していると推測される。(他のプロテアーゼとの比較からCys225と346の間でジスルフィド結合が形成されていると予想される。)

(実施例 8) 合成ペプチドを用いた組換え体 ARS 蛋白質の酵素活性の検出

MCA (4-Methyl-Coumaryl-7-Amide)でC末端を標識された合成ペプチドを用いて酵素的切断活性を検出する方法は特に断りの無い限り、論文報告された方法(Yasuoka, S. et al., Am. J. Respir. Cell Mol Biol., 16, 300-308, 1997)に従った。すなわち、MCAでC末端を標識された合成ペプチド(ペプチド研究所)を基質として、96穴プレートに終濃度100 μ MとなるようにTBS (20mM Tris-HCl (pH 7.5)、150mM NaCl)中に基質を希釈した。この基質溶液に実施例6に示したARS-FLAG、signal-FLAG-ARS-extracellular、signal-FLAG-ARS-SerPD、signal-FLAG-ARS-SerPD0培養上清及びコントロールとして空ベクターを遺伝子導入した場合の培養上清を添加した後、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。その後合成ペプチドから酵素により切断されて遊離したAMC (7-Amino-4-Methyl-Coumarin)の蛍光を蛍光測定プレートリーダー (Fluostar, SLT社)で励起波長390 nm、測定波長460 nmにて測定した。この結果、ARS-FLAG、signal-FLAG-ARS-extracellular、signal-FLAG-ARS-SerPD、signal-FLAG-ARS-SerPD0培養上清はいずれも空ベクターを遺伝子導入した場合の培養上清では得られない合成ペプチドBoc-Glu(OBzl)-Ala-Arg-MCA、Boc-Gln-Arg-Arg-MCA、及びBoc-Phe-Ser-Arg-MCAの切断活性を示した。

本実施例の方法において、切断された基質を用い、試験物質を存在させて測定を行うことにより、本発明のプロテアーゼ活性の阻害剤をスクリーニングすることができる。

(実施例 9) トリプシンビーズによる ARS の活性化

Signal-FLAG-ARS-extracellular 培養上清をトリプシンビーズ (Immobilized trypsin-Sepharose 4B ; Worthington 社)で処理した場合に人工基質の分解活性の上昇がみられるかを調べた。トリプシンビーズを用いた酵素の処理方法については特に断りの無い限り、論文報告された方法(Shigeki Satomi ら., Biochem. Biophys. Res. Com., 287, 995-1002, 2001)に従った。以下に詳細を示した。

酵素試料及びコントロール試料としては実施例 7 と同様にして得た signal-FLAG-ARS-extracellular 培養上清、空ベクターを遺伝子導入した場合の培養上清を用いた。0.1M炭酸アンモニウムバッファーで3回洗浄し、同バッファー中に懸濁したトリプシンビーズと、前述の各々の試料とを1:2~1:4の比率で混合

し、前記バッファー中、37℃で2時間処理をおこなった。処理後、遠心分離器（M150-IV型；佐久間製作所）で4℃、毎分3000回転で3分間遠心して上清を回収し、更に回収した上清を遠心分離器（M150-IV型；佐久間製作所）で4℃、毎分6000回転で3分間遠心して上清を回収することでトリプシンビーズを除去した。このようにして得られたトリプシンビーズ処理した酵素試料及びコントロール試料の人工基質 Boc-Glu(OBzl)-Ala-Arg-MCA の分解活性を実施例7で示した酵素活性検出法を用いて比較した。その結果、signal-FLAG-ARS-extracellular 培養上清をトリプシンビーズ処理した試料は、トリプシンビーズ未処理の場合と比べて10倍以上の活性の上昇が確認された。一方、コントロール試料、及び、トリプシン処理後のコントロール試料では人工基質の分解活性は観察されなかった。このことにより、ARSは他のプロテアーゼによる活性化の制御を受けている可能性が考えられた。Signal-FLAG-ARS-extracellular をトリプシン処理して得られる試料は、高活性であり、本発明のプロテアーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングするのに用いることが出来る。

（実施例10）signal-FLAG-ARS-extracellular 蛋白質の精製

signal-FLAG-ARS-extracellular 蛋白質発現細胞を用い、細胞の培養液中に分泌された組換え蛋白質を抽出、精製した。具体的には実施例7と同様の方法により、作製した形質転換 HEK293EBNA 細胞を80%程度コンフルエントになるまで培養した後、培地を取り除き、代わりに4%の血清を含む培地を加え、37℃、二酸化炭素濃度5%の条件で更に4日間培養を続けた。4日後にその培養上清を回収し、0.22 μ m フィルター（ザルトル社）でろ過したものをTBS バッファーで平衡化させた ANTI-FLAG M2-AGAROSE AFFINITY GEL（シグマ社）カラムに定法に従い吸着させた。その後、およそ50ml のTBS バッファーでカラムを洗浄後、0.1M グリシン塩酸溶液（pH 2.2）を6ml 用い、1ml ずつ分取した。分取した画分に直ちに100 μ l の1M Tris-HCl（pH 8）を加えてpHを調整した。ここで得られた各画分をN末端側に付加したFLAG タグに対する抗体（マウス抗FLAGモノクローナル抗体 M2；シグマ社）を用いたウエスタンブロッティングで確認した。すなわち、上記溶出画分をSDS/4%~20% アクリルアミドゲル（第一化学薬品社）で電気泳動

(還元条件) 後、ブロットイング装置を用いて PVDF 膜(ミリポア社)に転写した。転写後の PVDF 膜にブロックエース(大日本製薬社)を添加してブロッキングした後、ピオチン化マウス抗 FLAG モノクローナル抗体(M2; シグマ社)、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(アマシャムファルマシア社)を順次反応させた。反応後、ECL ウェスタンブロットイング検出システム(アマシャムファルマシア社)を用いて該蛋白の溶出画分を確認したところ、ほとんどのタンパクは 1 番目の画分に溶出されてきていることが分かったため、この溶出画分を以って精製蛋白溶出液とした。

(実施例 11) 合成ペプチドを用いた組換え体精製蛋白質酵素活性の検出

実施例 8 と同様の方法により MCA (4-Methyl-Coumaryl-7-Amide) で C 末端を標識された合成ペプチドを用いて実施例 10 で精製した酵素の切断活性を検出した。手法に関しては特に断りの無い限り、論文報告された方法(Yasuoka, S. et al., Am. J. Respir. Cell Mol Biol., 16, 300-308, 1997)に従った。具体的には、MCA で C 末端を標識された合成ペプチド(ペプチド研究所)を基質として、96 穴プレートに終濃度 200 μ M または 400 μ M となるように炭酸水素アンモニウム緩衝液中に基質を希釈した。この基質溶液に実施例 10 で得られた精製タンパク溶出液又はコントロールとして炭酸水素アンモニウム緩衝液を添加した後、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。その後合成ペプチドから酵素により切断されて遊離した AMC (7-Amino-4-Methyl-Coumarin) の蛍光を蛍光測定プレートリーダー(SAFIRE、TECAN 社製)で励起波長 390 nm、測定波長 460 nm にて測定した。結果を図 1 に示す。図 1 における白バーは緩衝液コントロール、黒バーは精製タンパク溶出液を用いた場合を示している。①は Boc-Glu(OBzl)-Ala-Arg-MCA、②は Boc-Phe-Ser-Arg-MCA、③は Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA、④は Boc-Gln-Arg-Arg-MCA、⑤は Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA、⑥は Suc-Ala-Pro-Ala-MCA、⑦は Boc-Glu-Lys-Lys-MCA、⑧は Boc-Leu-Lys-Arg-MCA、⑨は Boc-Leu-Gly-Arg-MCA、⑩は Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-MCA を基質とした場合を示している。

精製タンパク溶出液は緩衝液コントロールでは検出されない合成ペプチド Boc-Glu(OBzl)-Ala-Arg-MCA、Boc-Gln-Arg-Arg-MCA、Boc-Phe-Ser-Arg-MCA の切断活性

を示した。更に、今回新たに以下の基質、Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA、Boc-Glu-Lys-Lys-MCA、Boc-Leu-Lys-Arg-MCA、Boc-Leu-Gly-Arg-MCA、Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-MCA について検討したところ、精製蛋白質はこれら全ての基質を切断することが明らかとなった。

また、精製蛋白溶出液を用い実施例 9 と同様の方法によりトリプシンビーズ処理した酵素溶液を得た。この酵素溶液の基質切断活性を実施例 8 と同様の手法で測定した。すなわち、96 穴プレートに終濃度 400 μ M となるように炭酸水素アンモニウム緩衝液中に合成ペプチド基質を希釈し、前述の酵素溶液を混合して 37°C で 1 時間インキュベートした。その後合成ペプチドから酵素により切断されて遊離した AMC の蛍光を蛍光測定プレートリーダーで測定したところ、当該酵素溶液は合成ペプチド Boc-Glu(OBzl)-Ala-Arg-MCA、Boc-Gln-Arg-Arg-MCA、Boc-Phe-Ser-Arg-MCA、Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA、Boc-Glu-Lys-Lys-MCA、Boc-Leu-Lys-Arg-MCA、Boc-Leu-Gly-Arg-MCA、Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-MCA を切断する事がわかった。また、トリプシンビーズ処理した酵素溶液は、精製蛋白溶出液より高い切断活性を示した。

本実施例により、精製酵素、精製酵素トリプシンビーズ処理標品を用いることによっても、上記切断された基質を用い、試験物質を存在させて測定を行うことにより、本発明のプロテアーゼ活性の阻害剤をスクリーニングすることができることがわかった。

(実施例 12) 生理活性ペプチドを用いた酵素活性の検出

実施例 9 の方法と同様にトリプシンビーズ処理した signal-FLAG-ARS-extracellular 精製酵素を酵素試料として用い、以下の生理活性ペプチドと混合して 37°C、16 時間反応させた後に酵素活性を検出した。酵素未添加のコントロールとして炭酸水素アンモニウム緩衝液を用いた。ペプチドは 100mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH 8) 中でそれぞれ 0.1mM に調整しておいた。用いたペプチドは、アドレノコルチコトロピックホルモン (Adenocorticotrophic Hormone、ACTH)、アンジオテンシン 1-13 (Angiotensin 1-13)、アンジオテンシン 1-14 (Angiotensin 1-14)、アンジオテンシン 1-7 (Angiotensin 1-7)、アンジオテ

ンシン 1-9 (Angiotensin 1-9)、アンジオテンシン 3-7 (Angiotensin 3-7)、アンジオテンシン 3-8 (Angiotensin 3-8)、アンジオテンシン I (Angiotensin I)、アンジオテンシン I I (Angiotensin I I)、アンジオテンシン I I I (Angiotensin I I I)、A 型ナトリウム利尿ペプチド (A-type Natriuretic Peptide、ANP)、アペリン 13 (Apelin 13)、アペリン 36 (Apelin 36)、ビッグガストリン (Big Gastrin)、B 型ナトリウム利尿ペプチド 32 (B-type Natriuretic Peptide 32、BNP 32)、ブラジキニン (Bradykinin)、ベンゾイルグリシルヒスチジルロイシン (Benzoyl-Gly-His-Leu)、キモスタチン (Chymostatin)、C 型ナトリウム利尿ペプチド 22 (C-type Natriuretic Peptide-22、CNP22)、アルギニン欠失ブラジキニン (Des-Arg-Bradykinin)、ロイシン末エンケファリン (Leu-Enkephalin)、メチオニン末エンケファリン (Met-Enkephalin)、成長ホルモン (Growth Hormone、GH)、ガストリックインヒビタリーペプチド (Gastric Inhibitory peptide、GIP)、グルカゴン様ペプチド 1 (Glucagon-like peptide 1、GLP-1)、グルカゴン様ペプチド 2 (Glucagon-like peptide、(GLP-2)、グルカゴン (Glucagon)、成長ホルモン放出因子 (Growth Hormone Releasing Factor、GRF)、インシュリン (Insulin)、黄体形成ホルモン放出ホルモン (Luteinizing Hormone Releasing Hormon、LH-RH)、メラニン凝集ホルモン (Melanin-Concentrating Hormone、MCH)、メラニン細胞刺激ホルモン (α -Melanocyte Stimulating Hormon、 α -MSH)、モチリン (Motilin)、ニューロテンシン (Neurotensin)、ニューロペプチド Y (Neuropeptide Y、NPY)、オキシトシン (oxytosin)、脳下垂体アデニルシクラーゼ活性化ポリペプチド 38 (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide38、PACAP38)、プロラクチン放出ペプチド (Prolactin-Releasing Peptide、PrRP31)、ピログルタミックアペリン 13 (Pyr-Apelin13)、セクレチン (Secretin)、ソマトスタチン (somatostatin)、サブスタンス P (Substance P)、1,2,7,9 位 D 体アミノ酸置換型 11 位ロイシン型サブスタンス P ([D-Arg1,D-Pro2,D-Trp7,9,Leu11]- Substance P)、2,7,9 位 D 体アミノ酸置換型サブスタンス P ([D-Pro2,D-Trp7,9]-Substance P)、ウロテンシン I I (Urotensin II)、又は血管作用性消化管ペプチド (vasoactive intestinal

peptide、VIP) (すべてペプチド研究所社)である。基質ペプチドの切断は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (島津製作所製 LC-10AS) により、酵素液を入れて反応させた試料と、酵素の代わりに炭酸水素アンモニウム緩衝液を加えた試料とを分析比較することで確認した。

HPLC 条件

TOSO社製 TSK-gel ODS-80Tsカラム

カラム温度 40°C

測定波長 220 nm

溶媒液組成

A液: 10 mM 磷酸2水素カリウム緩衝液 (pH 7.4-8.0)

B液: 90%アセトニトリル: 10%超純水混合液

流速 1 ml / 1分

グラジエントプログラム

0分-5分 B conc. 0%

5分-30分 B conc. 80% (グラジエント)

30分-35分 B conc. 80% (一定)

35分-36分 B conc. 0% (戻し)

36分-40分 B conc. 0%

分析比較した結果、酵素試料はVIP、NPY、ANP、CNP、 α -MSH、MCHを選択的に切断することがわかった。VIP切断のHPLC分析の結果を図2及び図3に示す。図2は緩衝液コントロールを添加した場合、図3は酵素試料を添加した場合の図である。図の横軸はリテンションタイムを、縦軸は吸光度を示している。一般に同一条件でHPLCをおこなった場合、同一の物質が同程度の量含まれていれば、その物質は同一の検出時間帯 (リテンションタイム) に、同一のピーク面積という形のチャートという結果を得ることができる。本HPLCは同一の条件下でおこない、もともと溶解させておいたVIPの量を揃えておいたにも関わらず、緩衝液を反応系に加えた場合と、酵素試料を反応系に加えた場合とでは検出されるピークに違いが認められた。すなわち、特には、緩衝液では検出されなかったリテンションタイム 17.614及び18.800のピークが酵素試料添加の場合に検出された。これは酵素試料

添加によりVIPが切断され、違う物質を検出したことを示している。すなわち本酵素試料がVIPを切断したことを示している。

VIPは便秘症、特に女性患者数の多い便秘型の過敏性腸症候群の治療及び炎症性の消化管疾患の治療に有用であることが知られていることから、VIP切断活性を有する本発明のポリペプチドは消化管疾患治療薬のスクリーニングに有用であることがわかった。更に、本実施例の方法またはより簡便には実施例8又は実施例11の方法を消化管疾患治療薬をスクリーニングする方法として用いることができることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

本発明のポリペプチドは小腸に高発現するプロテアーゼまたはその前駆体である。本発明の前駆体は本発明のプロテアーゼを得るために有用である。本発明のプロテアーゼはVIP切断活性を有することから、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベクター、及び細胞は、消化管疾患治療薬のスクリーニングに有用である。

配列表フリーテキスト

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号3、4、20、22～26の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請 求 の 範 囲

1. 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第237番～第531番のアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示す酵素であるポリペプチド。
2. 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第237番～第531番のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
3. 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第51番～第531番のアミノ酸配列を含み、しかも、プロテアーゼ活性を示す酵素の前駆体であるポリペプチド。
4. 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第50番のアミノ酸配列、あるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第50番のアミノ酸配列の1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入された配列を含むアミノ酸配列のC末端側に、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第51番～第531番のアミノ酸配列が連結されたアミノ酸配列を含み、かつ、プロテアーゼ活性を示す酵素の前駆体であるポリペプチド。
5. 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド又は配列番号2で表されるアミノ酸配列における第51番～第531番のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
6. 請求の範囲1乃至請求の範囲5に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
7. 請求の範囲6に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
8. 請求の範囲7に記載の発現ベクターで形質転換された細胞。
9. i) 請求の範囲1または請求の範囲2に記載のポリペプチドと、ii) 前記ポリペプチドにより切断可能な基質と、iii) 試験化合物とを接触させる工程、
前記基質の切断を分析する工程、及び
前記基質を切断する活性を阻害する物質を選択する工程
を含む、消化管疾患治療薬をスクリーニングする方法。
10. 請求の範囲9に記載のスクリーニング方法を用いてスクリーニングする工程、
及び

前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程を含むことを特徴とする、消化管疾患治療用医薬組成物の製造方法。

1/2

Fig1.

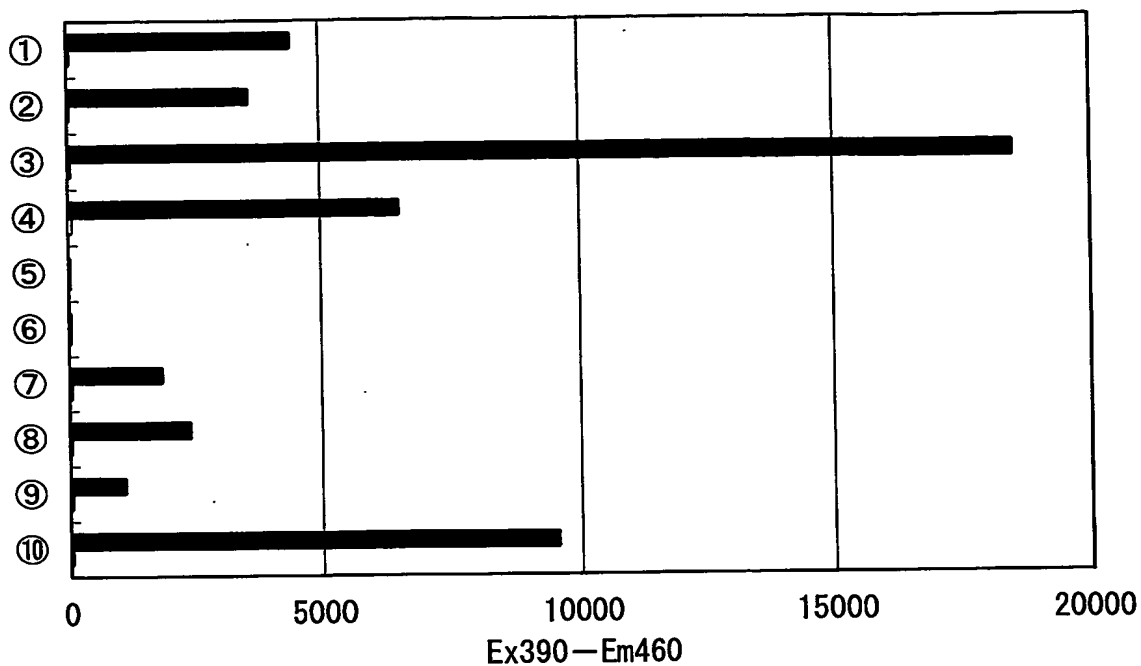
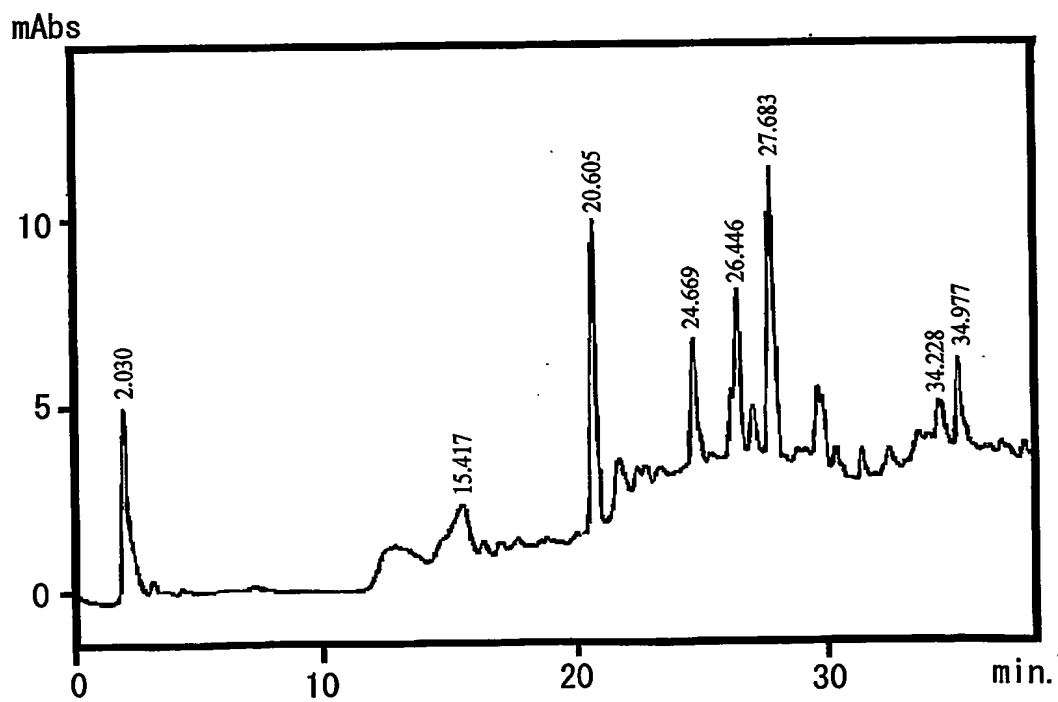
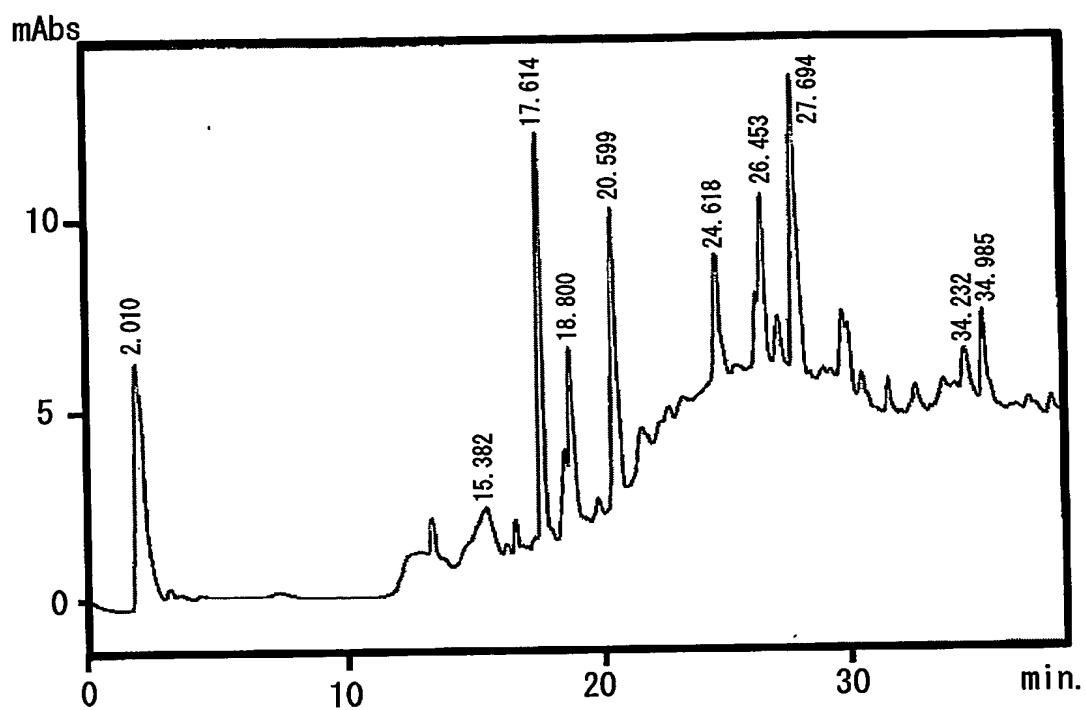


Fig2.



2/2

Fig3.



1/16

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Novel serine protease

<130> Y0334-PCT

<150> JP2002-223878

<151> 2002-07-31

<160> 26

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1596

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1593)

<223> Inventor: Takeda, Masayoshi; Yamaji, Noboru

<400> 1

atg gag ccc act gtg gct gac gta cac ctc gtg ccc agg aca acc aag 48
Met Glu Pro Thr Val Ala Asp Val His Leu Val Pro Arg Thr Thr Lys
1 5 10 15

gaa gtc ccc gct ctg gat gcc gcg tgc tgt cga gcg gcc agc att ggc 96
Glu Val Pro Ala Leu Asp Ala Ala Cys Cys Arg Ala Ala Ser Ile Gly
20 25 30

gtg gtg gcc acc agc ctt gtc gtc ctc acc ctg gga gtc ctt ttg gcc 144

2/16

Val Val Ala Thr Ser Leu Val Val Leu Thr Leu Gly Val Leu Leu Ala
 35 40 45

ttc ctc tct aca cag ggc ttc cac gtg gac cac acg gcc gag ctg cgg 192
 Phe Leu Ser Thr Gln Gly Phe His Val Asp His Thr Ala Glu Leu Arg
 50 55 60

gga atc cgg tgg acc agc agt ttg cgg cgg gag acc tcg gac tat cac 240
 Gly Ile Arg Trp Thr Ser Ser Leu Arg Arg Glu Thr Ser Asp Tyr His
 65 70 75 80

cgc acg ctg acg ccc acc ctg gag gca ctg ttt gta agt agt ttt cag 288
 Arg Thr Leu Thr Pro Thr Leu Glu Ala Leu Phe Val Ser Ser Phe Gln
 85 90 95

aag aca gag tta gag gca agc tgc gtg ggt tgc tcg gta ctg aat tat 336
 Lys Thr Glu Leu Glu Ala Ser Cys Val Gly Cys Ser Val Leu Asn Tyr
 100 105 110

agg gat ggg aac tcc agt gtc ctc gta cat ttc cag ctg cac ttt ctg 384
 Arg Asp Gly Asn Ser Ser Val Leu Val His Phe Gln Leu His Phe Leu
 115 120 125

ctg cga ccc ctc cag acg ctg agc ctg ggc ctg gag gag gag cta ttg 432
 Leu Arg Pro Leu Gln Thr Leu Ser Leu Gly Leu Glu Glu Glu Leu Leu
 130 135 140

cag cga ggg atc cgg gca agg ctg cgg gag cac ggc atc tcc ctg gct 480
 Gln Arg Gly Ile Arg Ala Arg Leu Arg Glu His Gly Ile Ser Leu Ala
 145 150 155 160

gcc tat ggc aca att gtg tog gct gag ctc aca ggg aga cat aag gga 528
 Ala Tyr Gly Thr Ile Val Ser Ala Glu Leu Thr Gly Arg His Lys Gly
 165 170 175

ccc ttg gca gaa aga gac ttc aaa tca ggc cgc tgt cca ggg aac tcc 576

3/16

Pro Leu Ala Glu Arg Asp Phe Lys Ser Gly Arg Cys Pro Gly Asn Ser
 180 185 190

ttt tcc tgc ggg aac agc cag tgt gtg acc aag gtg aac ccg gag tgt 624
 Phe Ser Cys Gly Asn Ser Gln Cys Val Thr Lys Val Asn Pro Glu Cys
 195 200 205

gac gac cag gag gac tgc tcc gat ggg tcc gac gag gcg cac tgc gag 672
 Asp Asp Gln Glu Asp Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Ala His Cys Glu
 210 215 220

tgt ggc ttg cag cct gcc tgg agg atg gcc ggc agg atc gtg ggc ggc 720
 Cys Gly Leu Gln Pro Ala Trp Arg Met Ala Gly Arg Ile Val Gly Gly
 225 230 235 240

atg gaa gca tcc ccg ggg gag ttt ccg tgg caa gcc agc ctt cga gag 768
 Met Glu Ala Ser Pro Gly Glu Phe Pro Trp Gln Ala Ser Leu Arg Glu
 245 250 255

aac aag gag cac ttc tgt ggg gcc gcc atc atc aac gcc agg tgg ctg 816
 Asn Lys Glu His Phe Cys Gly Ala Ala Ile Ile Asn Ala Arg Trp Leu
 260 265 270

gtg tct gct gct cac tgc ttc aat gag ttc caa gac ccg acg aag tgg 864
 Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asn Glu Phe Gln Asp Pro Thr Lys Trp
 275 280 285

gtg gcc tac gtg ggt gcg acc tac ctc agc ggc tcg gag gcc agc acc 912
 Val Ala Tyr Val Gly Ala Thr Tyr Leu Ser Gly Ser Glu Ala Ser Thr
 290 295 300

gtg cgg gcc cag gtg gtc cag atc gtc aag cac ccc ctg tac aac gcg 960
 Val Arg Ala Gln Val Val Gln Ile Val Lys His Pro Leu Tyr Asn Ala
 305 310 315 320

gac acg gcc gac ttt gac gtg gct gtg ctg gag ctg acc agc cct ctg 1008

4/16

Asp Thr Ala Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Glu Leu Thr Ser Pro Leu	
325 330 335	
cct ttc ggc cgg cac atc cag ccc gtg tgc ctc ccg gct gcc aca cac	1056
Pro Phe Gly Arg His Ile Gln Pro Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr His	
340 345 350	
atc ttc cca ccc agc aag aag tgc ctg atc tca ggc tgg ggc tac ctc	1104
Ile Phe Pro Pro Ser Lys Lys Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Tyr Leu	
355 360 365	
aag gag gac ttc ctg gtc aag cca gag gtg ctg cag aaa gcc act gtg	1152
Lys Glu Asp Phe Leu Val Lys Pro Glu Val Leu Gln Lys Ala Thr Val	
370 375 380	
gag ctg ctg gac cag gca ctg tgt gcc agc ttg tac ggc cat tca ctc	1200
Glu Leu Leu Asp Gln Ala Leu Cys Ala Ser Leu Tyr Gly His Ser Leu	
385 390 395 400	
act gac agg atg gtg tgc got gcc tac ctg gac ggg aag gtg gac tcc	1248
Thr Asp Arg Met Val Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Lys Val Asp Ser	
405 410 415	
tgc cag ggt gac tca gga gga ccc ctg gtc tgc gag gag ccc tct ggc	1296
Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Glu Pro Ser Gly	
420 425 430	
cgg ttc ttt ctg gct gcc atc gtg agc tgg gga atc ggg tgt gcg gaa	1344
Arg Phe Phe Leu Ala Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Glu	
435 440 445	
gcc cgg cgt cca ggg gtc tat gcc cga gtc acc agg cta cgt gac tgg	1392
Ala Arg Arg Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Thr Arg Leu Arg Asp Trp	
450 455 460	
atc ctg gag gcc acc acc aaa gcc agc atg cct ctg gcc ccc acc atg	1440

5/16

Ile Leu Glu Ala Thr Thr Lys Ala Ser Met Pro Leu Ala Pro Thr Met
 465 470 475 480

gct cct gcc cct gcc gcc ccc agc aca gcc tgg ccc acc agt cct gag 1488
 Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Thr Ala Trp Pro Thr Ser Pro Glu
 485 490 495

agc cct gtg gtc agc acc ccc acc aaa tcg atg cag gcc ctc agt acc 1536
 Ser Pro Val Val Ser Thr Pro Thr Lys Ser Met Gln Ala Leu Ser Thr
 500 505 510

gtg cct ctt gac tgg gtc acc gtt cct aag cta caa ggt att ttc ggg 1584
 Val Pro Leu Asp Trp Val Thr Val Pro Lys Leu Gln Gly Ile Phe Gly
 515 520 525

gca gaa agg tag 1596
 Ala Glu Arg
 530

<210> 2
 <211> 531
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Pro Thr Val Ala Asp Val His Leu Val Pro Arg Thr Thr Lys
 1 5 10 15

Glu Val Pro Ala Leu Asp Ala Ala Cys Cys Arg Ala Ala Ser Ile Gly
 20 25 30

Val Val Ala Thr Ser Leu Val Val Leu Thr Leu Gly Val Leu Leu Ala

6/16

35

40

45

Phe Leu Ser Thr Gln Gly Phe His Val Asp His Thr Ala Glu Leu Arg
50 55 60

Gly Ile Arg Trp Thr Ser Ser Leu Arg Arg Glu Thr Ser Asp Tyr His
65 70 75 80

Arg Thr Leu Thr Pro Thr Leu Glu Ala Leu Phe Val Ser Ser Phe Gln
85 90 95

Lys Thr Glu Leu Glu Ala Ser Cys Val Gly Cys Ser Val Leu Asn Tyr
100 105 110

Arg Asp Gly Asn Ser Ser Val Leu Val His Phe Gln Leu His Phe Leu
115 120 125

Leu Arg Pro Leu Gln Thr Leu Ser Leu Gly Leu Glu Glu Glu Leu Leu
130 135 140

Gln Arg Gly Ile Arg Ala Arg Leu Arg Glu His Gly Ile Ser Leu Ala
145 150 155 160

Ala Tyr Gly Thr Ile Val Ser Ala Glu Leu Thr Gly Arg His Lys Gly
165 170 175

Pro Leu Ala Glu Arg Asp Phe Lys Ser Gly Arg Cys Pro Gly Asn Ser

7/16

180

185

190

Phe Ser Cys Gly Asn Ser Gln Cys Val Thr Lys Val Asn Pro Glu Cys
195 200 205

Asp Asp Gln Glu Asp Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Ala His Cys Glu
210 215 220

Cys Gly Leu Gln Pro Ala Trp Arg Met Ala Gly Arg Ile Val Gly Gly
225 230 235 240

Met Glu Ala Ser Pro Gly Glu Phe Pro Trp Gln Ala Ser Leu Arg Glu
245 250 255

Asn Lys Glu His Phe Cys Gly Ala Ala Ile Ile Asn Ala Arg Trp Leu
260 265 270

Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asn Glu Phe Gln Asp Pro Thr Lys Trp
275 280 285

Val Ala Tyr Val Gly Ala Thr Tyr Leu Ser Gly Ser Glu Ala Ser Thr
290 295 300

Val Arg Ala Gln Val Val Gln Ile Val Lys His Pro Leu Tyr Asn Ala
305 310 315 320

Asp Thr Ala Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Glu Leu Thr Ser Pro Leu

8/16

325

330

335

Pro Phe Gly Arg His Ile Gln Pro Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr His
340 345 350

Ile Phe Pro Pro Ser Lys Lys Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Tyr Leu
355 360 365

Lys Glu Asp Phe Leu Val Lys Pro Glu Val Leu Gln Lys Ala Thr Val
370 375 380

Glu Leu Leu Asp Gln Ala Leu Cys Ala Ser Leu Tyr Gly His Ser Leu
385 390 395 400

Thr Asp Arg Met Val Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Lys Val Asp Ser
405 410 415

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Glu Pro Ser Gly
420 425 430

Arg Phe Phe Leu Ala Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Glu
435 440 445

Ala Arg Arg Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Thr Arg Leu Arg Asp Trp
450 455 460

Ile Leu Glu Ala Thr Thr Lys Ala Ser Met Pro Leu Ala Pro Thr Met

9/16

465

470

475

480

Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Thr Ala Trp Pro Thr Ser Pro Glu
485 490 495

Ser Pro Val Val Ser Thr Pro Thr Lys Ser Met Gln Ala Leu Ser Thr
500 505 510

Val Pro Leu Asp Trp Val Thr Val Pro Lys Leu Gln Gly Ile Phe Gly
515 520 525

Ala Glu Arg
530

<210> 3
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 3
ccatcctaatacgactcactatagggc

27

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

10/16

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 4

actcactata gggctcgagc ggc

23

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

aggatccagt cacgtagcct ggtgactcg

29

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gtagccccag cctgagatca ggcacttctt g

31

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cgttgatgat ggcggcccca cagaagtgc

29

11/16

<210> 8
<211> 29
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
ctcgaaggct ggcttgccac ggaaactcc 29

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
ctcagccgac acaattgtgc cataggcagc 30

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
cttgcccgga tccctcgctg caatagctcc 30

<210> 11
<211> 29
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
cgccgcaaac tgcttgtcca ccggattcc 29

12/16

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
cttgcccgga tccctcgctg caatagctcc 30

<210> 13
<211> 32
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
aaaggactcc cagggtgagg acgacaaggc tg 32

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
tggccaccac gccaatgggtg gccgctcgac 30

<210> 15
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
cgtgagctgg ggaatcgggt gtgcggaagc c 31

13/16

<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 16
gogtccaggg gtctatgccc gagtcaccag 30

<210> 17
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 17
atgccgcgtg ctgtcgagcg gccaccattg 30

<210> 18
<211> 34
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 18
atggagccca ctgtggctga cgtacacctc gtgc 34

<210> 19
<211> 28
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 19
cttgtagctt aggaacggtg acccagtc 28

14/16

<210> 20
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 20
aatctagagc catggagccc actgtggctg acgtacac

38

<210> 21
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 21
gtgcgggccc aggtggtcca gatcgtcaag

30

<210> 22
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 22
aagcggccgc cttttctgcc ccgaaaatac cttgtag

37

<210> 23

15/16

<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 23

aagatctcta cacagggctt ccacgtggac cacac

35

<210> 24
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 24

aactogagct acctttctgc cccgaaaata cc

32

<210> 25
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 25

aagatcttgg tgggcggcat ggaagcat

28

16/16

<210> 26
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 26
aactcgagct accagtcacg tagcc

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP03/09677

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/57, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00, 9/64, C12Q1/37,
G01N33/15, 33/50, 33/53, A61K45/00, A61P1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/57, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00, 9/64, C12Q1/37,
G01N33/15, 33/50, 33/53, A61K45/00, A61P1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/38744 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.), 16 May, 2002 (16.05.02), Full text (Family: none)	1-15
A	WO 01/96378 A2 (BAYER AG.), 20 December, 2001 (20.12.01), Full text & EP 1309676 A2	1-15
A	WO 02/08392 A2 (BAYER AG.), 31 January, 2002 (31.01.02), Full text (Family: none)	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
09 September, 2003 (09.09.03)

Date of mailing of the international search report
24 September, 2003 (24.09.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/09677

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/00860 A2 (SUGEN, INC.), 03 January, 2002 (03.01.02), Full text & US 2002/0064856 A1	1-15
A	WO 01/57194 A2 (CORVAS INTERNATIONAL, INC.), 09 August, 2001 (09.08.01), Full text & EP 1252300 A2 & US 2003/0119168 A1 & JP 2003-521920 A	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/57, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00, 9/64, C12Q1/37, G01N33/15, 33/50, 33/53, A61K45/00, A61P1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/57, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00, 9/64, C12Q1/37, G01N33/15, 33/50, 33/53, A61K45/00, A61P1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 02/38744 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.) 2002. 05. 16 全文 (ファミリーなし)	1-15
A	WO 01/96378 A2 (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 2001. 12. 20 全文 & EP 1309676 A2	1-15
A	WO 02/08392 A2 (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 2002. 01. 31 全文 (ファミリーなし)	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.09.03

国際調査報告の発送日

24.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4B

3131

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 02/00860 A2 (SUGEN, INC.) 2002. 01. 03 全文 & US 2002/0064856 A1	1-15
A	WO 01/57194 A2 (CORVAS INTERNATIONAL, INC.) 2001. 08. 09 全文 & EP 1252300 A2 & US 2003/0119168 A1 & JP 2003-521920 A	1-15